

**EFEITO DO TRATAMENTO COM MODULADORES SELETIVOS DE
RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (SERMs) SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR
E SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM
RATAS OVARECTOMIZADAS**

Aline Zandonadi Lamas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória-ES, dezembro de 2009**

ALINE ZANDONADI LAMAS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM MODULADORES SELETIVOS DE
RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (SERMs) SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR
E SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM
RATAS OVARECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a Nazaré Souza Bissoli

Vitória, dezembro de 2009

Lista de Figuras e Tabelas:

	Página
Figura 1: Resposta das células Th1 e Th2 pelo estímulo de células T CD4+ e a liberação de citocinas. Linhas contínuas indicam estimulação da via, linhas pontilhadas indicam inibição. APC= célula apresentadora de antígeno.	13
Figura 2: Estrutura química do 17 β -estradiol e raloxifeno.	16
Figura 3: Organograma do Protocolo Experimental.	20
Figura 4: Fotografia da técnica de execução da ovariectomia.	20
Figura 5: Em (A) fotografia da artéria mesentérica superior. Em (B) fotografia do leito mesentérico, após canulação da artéria mesentérica, sendo perfundido pela solução nutritiva.	25
Tabela 1: Peso Corporal (PC gramas), Peso do útero / peso corporal (PU/PC mg/g) nos grupos: SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com estrogênio (EST), raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM)	29
Figura 6: Representação do peso corporal inicial e do peso corporal final (gramas) dos grupos sham, ovariectomizada (OVX), ovariectomizada tratada com estrogênio (EST), tratada com raloxifeno (RAL) e tratada com tamoxifeno (TAM). **p<0.01 e *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM; $\Delta\Delta$ p<0,01 comparado ao CAST; $\#\#$ p< 0,01 comparado ao EST; $\$\$$ p<0,01 comparado ao RAL; $^{++}$ p<0,01 comparado ao TAM.	29
Figura 7: Valores da razão do peso do útero úmido pelo peso corporal do animal (mg/g) dos grupos sham, ovariectomizada (OVX), ovariectomizada tratada com estrogênio (EST), tratada com raloxifeno (RAL) e tratada com tamoxifeno (TAM). **p<0.01 e *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM; $\#\#$ p< 0,01 e $\#$ p<0,05 comparado ao EST; $\$\$$ p<0,01 comparado ao RAL; $^{++}$ p<0,01 comparado ao TAM.	30
Figura 8: Valores da razão do peso do útero seco pelo peso corporal do animal (mg/g) dos grupos sham, ovariectomizada	30

(OVX), ovariectomizada tratada com estrogênio (EST), tratada com raloxifeno (RAL) e tratada com tamoxifeno (TAM). ** $p < 0.01$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM; ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ comparado ao EST; \$\$ $p < 0,01$ comparado ao RAL; ++ $p < 0,01$ comparado ao TAM.

Tabela 2: Valor da Resposta Máxima (Emáx) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico em resposta a injeção crescentes de Acetilcolina (Ach) *in bolus* nos grupos Fêmea Sham (SHAM), Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas Tratadas com Raloxifeno (RAL), Tamoxifeno (TAM) e Estrogênio (EST) na ausência e na presença de indometacina (2,8 x 10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M). 32

Figura 9: Curva dose-resposta a acetilcolina (Ach) induzindo vasorelaxamento no leito mesentérico nos grupos (■) Sham, (▲) OVX, (Δ) Estrogênio, (◇) Raloxifeno e (●) Tamoxifeno na ausência (A) e na presença dos bloqueadores indometacina (2,8 x 10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M) (B). 33

Tabela 3: Valor da Resposta Máxima (Emáx) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico em resposta a injeção crescentes de Noradrenalina (NA) *in bolus* nos grupos Fêmea Sham (SHAM), Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas Tratadas com Raloxifeno (RAL), Tamoxifeno (TAM) e Estrogênio (EST) na ausência de bloqueadores e na presença de Indometacina (2,8 x 10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M). 34

Figura 10: Curva dose-resposta a noradrenalina (NA) induzindo vasoconstricção no leito mesentérico nos grupos (■) Sham, (▲) OVX, (Δ) Estrogênio, (◇) Raloxifeno e (●) Tamoxifeno na ausência (A) e na presença de bloqueadores indometacina (2,8 x 10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M) (B). 35

Tabela 4: Valor da Resposta Máxima (Emáx) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico em resposta a injeção crescentes de Noradrenalina (NOR) *in bolus* nos grupos (a) Fêmea Sham (SHAM), (b) Fêmea Ovariectomizada (OVX), na ausência de bloqueadores (Pre) e na presença de Aminoguanidina (AG) (10⁻⁴ M) e L-NAME (10⁻⁴ M). 37

Figura 11: Curva dose-resposta a noradrenalina (NA) no leito mesentérico nos grupos Sham (A) e OVX (B) na ausência de bloqueadores (pre), na presença de um bloqueador específico de iNOS (aminoguanidina) e na presença de um bloqueador inespecífico da NOS (L-NAME) ^{cc} $p < 0,001$ quando comparado a 38

fase sem bloqueio (pre) dentro do mesmo grupo. ^{§§}p<0,001 quando comparado ao bloqueio com aminoguanidina dentro do mesmo grupo.

Tabela 5: Marcadores da Inflamação. O impacto da Terapia Hormonal nos animais ovariectomizados tratados com Raloxifeno, Tamoxifeno e Estrogênio. 39

Figura 12: Representação dos níveis séricos de IL-6 e TNF- α nos grupos sham, ovariectomizada (Ovx), Estrogênio (Est), Raloxifeno (Ral), Tamoxifeno (Tam). ^{**}p<0.01 and ^{*}p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM; ^{##}p< 0,01 comparado ao EST; ^{§§} p<0,01 comparado ao RAL; ⁺⁺p<0.01comparados ao TAM 40

Figura 13: Envolvimento do TNF- α na disfunção endotelial. AA: ácido araquidônico. 46

Figura 14: Demonstração de numerosos fatores de risco que podem contribuir para a disfunção endotelial. 48

Lista de Abreviaturas:

Ach – acetilcolina

AG- aminoguanidina

All: angiotensina II

DCV- doenças cardiovasculares

EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio

E_{max} – resposta máxima

eNOS- óxido nítrico sintetase endotelial

EPM: erro padrão da média

ERK: kinase de sinalização extracelular

EST – estrogênio

ET: endotelina

IL - interleucina

iNOS – óxido nítrico sintetase induzível

L-NAME - N^w-nitro-L-arginina metil ester

LVM - leito vascular mesentérico

M – molaridade

MAPK: proteína ativadora de mitose

mmHg – milímetros de mercúrio

NA – noradrenalina

NO - óxido nítrico

OVX – ovariectomia

pD₂ – concentração na qual se obtém 50% da resposta máxima

PGI₂ - prostaciclina

PPM - pressão de perfusão média

RAL – raloxifeno

ROS – espécies reativas de oxigênio

TAM – tamoxifeno

TH- terapia hormonal

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO:

Lista de Figuras e Tabelas	
Lista de abreviaturas	
Resumo	
1. INTRODUÇÃO	página
1.1. Citocinas.....	12
1.2. Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio (SERMs).....	15
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Animais experimentais.....	19
3.2. Grupos experimentais.....	19
3.3. Protocolo experimental.....	19
3.4. Ovariectomia.....	20
3.5. Tratamento com SERMs.....	21
3.6. Tratamento com estrogênio.....	21
3.7. Reatividade do Leito mesentérico.....	21
3.7.1. Protocolos do estudo da reatividade vascular.....	23
3.8. Estimativa da massa do útero.....	26
3.9. Técnica ELISA.....	26
3.10. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS	
4.1. Verificação do peso corporal inicial e final, peso do útero.....	28
4.2. Reatividade Vascular.....	31
4.2.1. Avaliação da participação da iNOS na reatividade vascular.....	36
4.3. Análise dos níveis séricos de IL-6 e TNF- α	39
5. DISCUSSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que a incidência de doenças cardiovasculares (DCV) em mulheres no período fértil é menor que em homens da mesma faixa etária. Entretanto, comparando mulheres na pós-menopausa, esses índices se igualam com homens de mesma idade (Lerner & Kannel, 1986; Barrett-Connor, 1997). Mulheres na fase pós-menopausa podem exibir aumento de marcadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias (Kamada et al, 2001), na qual essas têm sido correlacionadas com o aumento do risco de DCV. Mediante essa ligação entre DCV e processo inflamatório (Ridker et al, 2000) há necessidade de investigar possíveis terapias hormonais (TH) efetivas e seguras para serem usadas na fase pós-menopausa, no intuito de normalizar a disfunção vascular e a inflamação que são, geralmente, encontradas em mulheres nesta fase da vida. Para melhor entendimento dos fatores envolvidos segue uma breve revisão sobre citocinas, como marcadores inflamatórios, assim como dos Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio (SERMs) como terapias alternativas em mulheres na pós-menopausa, uma vez que foram objeto do presente estudo.

1.1.CITOCINAS:

Citocinas são grupos de pequenas proteínas, glicoproteínas e/ou peptídeos produzidos por diversas células do sistema imunológico e células vasculares. Pequenas concentrações, em nível de picomolar e nanomolar são suficientes para ativar receptores específicos e modular as funções das diversas células e tecidos. Grande maioria das citocinas pode estar ligada à membrana celular ou presentes na matriz extracelular, ou seja, alternar entre as formas insolúveis e solúveis, respectivamente, podendo esta mudança de solubilidade ser um importante evento regulatório. Diferentes tipos de células podem secretar o mesmo tipo de citocina, e uma mesma citocina pode atuar em diversos tipos de células (pleiotropia) e produzir múltiplas atividades biológicas, dependendo do tipo de célula, tempo e contexto (Hirano,1999).

Citocinas são produzidas por linfócitos T CD4⁺ ou auxiliares, que são diferenciados pelo perfil das citocinas produzidas por cada um, sendo chamados linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 ou Th2), como demonstrado na figura 1. Essas células se desenvolvem a partir de um mesmo precursor e podem apresentar função regulatória uma sobre a atividade da outra. As células Th1 secretam altos níveis de interleucina-2 (IL-2), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interferon gama (INF- γ) e promovem a ativação de macrófagos e de células que promovem a resposta imune. Já as células Th2 produzem uma variedade de outras citocinas, incluindo interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), que são responsáveis pelos componentes da resposta humoral.

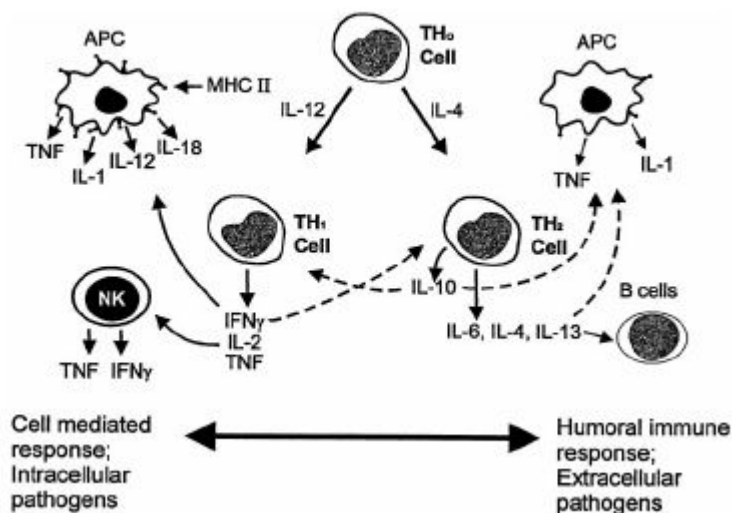


Figura 1: Resposta das células Th1 e Th2 pelo estímulo de células T CD4⁺ e a liberação de citocinas. Linhas contínuas indicam estimulação da via, linhas pontilhadas indicam inibição. APC= célula apresentadora de antígeno (Opal & DePalo 2000)

Um importante mecanismo de defesa diante de injúrias as células do organismo é a resposta inflamatória. A inflamação é um componente essencial na resposta imune da patogênese e danos celulares (Alexander et al, 2009). Para uma resposta inflamatória adequada, é necessária uma dinâmica do balanço da homeostase existente entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias. Entretanto, a regulação da inflamação pelas citocinas e pelos seus inibidores é um fato complicado, pois há vias redundantes e como múltiplos elementos tendo efeitos fisiológicos similares (Ozaki et al, 2002).

Como exposto anteriormente, as citocinas são produzidas em resposta a estímulos inflamatórios, principalmente por macrófagos e células Th, mas também são produzidas por outras células inflamatórias, bem como as células vasculares e adipócitos. As adipocinas são um grupo de citocinas baseadas pela sua produção no tecido adiposo e muitas como o TNF- α , são estabelecidas como fatores pró-inflamatórios no processo de aterosclerose (Kamari et al, 2006)

Cada citocina liga-se a receptores específicos e iniciam uma cascata de sinais intracelulares, porém como explicar as múltiplas e variadas propriedades de uma única citocina? Em muitos casos, seus receptores são encontrados em um único tipo de célula, em outros casos, receptores são encontrados em vários tipos de células, por exemplo, TNF- α . Neste caso, o tipo de célula que irá definir a propriedade que a citocina irá desempenhar (Dinarello, 2007). Ao interagirem com os receptores específicos em células-alvo, ocorre a fosforilação de proteínas quinases presentes nos domínios de receptores de citocinas (Taniguchi, 1995). O TNF- α é considerado uma das mais potentes citocinas pró-inflamatórias capaz de ativar várias vias de transdução de sinal, como a PI3-Kinase/ Akt ou MAPK(proteína quinase ativadora de mitose) e outras quinases de sinalização extracelular, como a ERK $\frac{1}{2}$ (kinase reguladora de sinalização extracelular), p38 MAPK (Surapisitchat et al., 2001).

É bem aceito que a inflamação crônica é a maior condição básica para doenças relacionadas com a idade, com a aterosclerose, artrite, câncer, osteoporose, doenças vasculares entre outras (Yu & Chung, 2006). Adicionalmente, a perda da função ovariana também pode ser considerada um fator de risco específico para essas enfermidades citadas e, segundo Stevenson (2000) as mulheres na pós-menopausa talvez tenham o dobro da incidência de doenças cardiovasculares do que mulheres na pré-menopausa.

Segundo dados da ONU, a expectativa de vida ao nascer aumentou de 46,5 anos, em 1950-1955, para 65, em 1995-2000. O Brasil acompanhou essa evolução, estando sempre um pouco acima da média mundial: 50,9 anos em 1950-55 para 67,2 em 1995-2000. Diante de maior expectativa de vida, maior número de mulheres tem chegado à fase pós-menopausa, sendo que a menopausa, que é a última menstruação, ocorre naturalmente em torno dos 50 anos de idade. Significando que

um maior número de mulheres poderá viver em uma condição de importante alteração de produção hormonal, que propiciará um aumento na prevalência de doenças como as cardiovasculares, a osteoporose, os cânceres de mama e de útero e os distúrbios da função cognitiva (Byyny & Speroff, 1996; Wild, 1996).

Um estudo realizado por Sampfer e colaboradores (1991) sugere que a Terapia Hormonal (TH) com estrogênio em mulheres após a menopausa está associada à redução de até 50% na incidência de eventos cardíacos evidenciando, assim, a função cardioprotetora dos hormônios sexuais femininos. Entretanto, estudos como o Women Health Initiated (WHI) e o Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) mostram o contrário, com um aumento de eventos cardiovasculares (Hulley et al., 1998; Roussouw et al., 2002). Portanto, estudos seguros e eficazes que avaliem a terapia hormonal pós-menopausa são de grande relevância.

As terapias hormonais alternativas surgiram como forma de reverter possíveis alterações decorrentes da deficiência ovariana, na tentativa de protegerem a mulher de doenças cardiovasculares, prevenirem a osteoporose, o câncer de mama e útero e minimizar os distúrbios da função cognitiva, uma vez que estes são os principais sinais e sintomas na mulher pós-menopausa (Byyny & Speroff, 1996; Wild, 1996). Entre essas novas terapias encontram-se os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), como por exemplo, o raloxifeno e o tamoxifeno.

1.2. Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio (SERMs)

Os SERMs são moléculas não esteroidais com efeitos agonistas/antagonistas estrogênico tecido específico. Estes compostos interagem com os receptores de estrogênio como ligantes e, diferencialmente, recrutam co-ativadores ou co-expressores a produzirem seus efeitos (Nilsson et al, 2005) Os SERMs deste estudo são amplamente prescritos na prática clínica.

O cloridrato de raloxifeno é um derivado benzotiofênico não-esteroidal, que tem efeitos agonista no osso e sistema cardiovascular, e efeitos antagonistas sobre os receptores de estrogênio presentes no útero, sendo amplamente usado para

prevenção e tratamento de osteoporose. (Sato et al, 1996). O uso do raloxifeno está associado com aumento da densidade mineral óssea, e manutenção da arquitetura normal do osso. O raloxifeno modula a reabsorção óssea, por dois mecanismos básicos: inibição da atividade osteoclástica e indução da atividade osteoblástica (Taranta et al, 2002). Na figura 2 representada abaixo demonstra na parte inferior da estrutura do raloxifeno liga-se ao receptor de estrógeno, enquanto a cadeia lateral básica se liga a um sítio diferente e leva às propriedades antagonistas do composto (Lufkin et al, 1998)

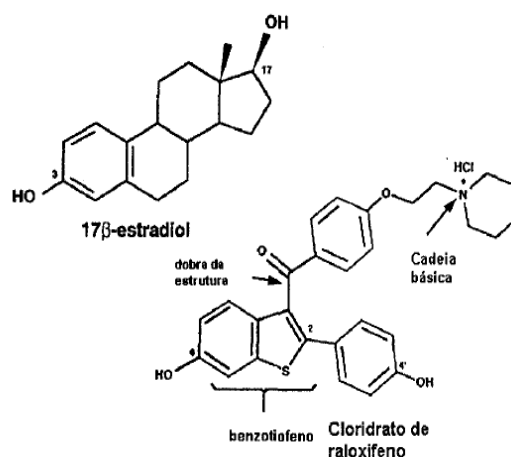


Figura 2: Estrutura química do 17β-estradiol e raloxifeno (Lufkin et al, 1998)

O citrato de tamoxifeno é um derivado trifeniletileno, este foi o primeiro SERM a ser identificado na década de 1960, foi aprovado pela Food and Drug Administration em 1977, e tem sido amplamente utilizado para o tratamento e prevenção subsequente de câncer de mama, devido à sua atividade antagonista na mama (Osborne, 1998). Entretanto, seu uso prolongado pode aumentar o risco de câncer de endométrio (Cosman & Lindsay, 1999). Assim, o tamoxifeno, age como antagonista em receptores de estrogênio presentes na mama e como agonista no útero (Dutertre & Smith, 2000).

Entretanto, o uso de tamoxifeno e raloxifeno apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, esses fármacos não aliviam os sintomas vasomotores (ondas de calor e suores noturnos), associada com a perda de estrogênio e, muitas vezes agravam a sua frequência e/ou intensidade (Cosman & Lindsay, 1999). Porém, em relação à reatividade vascular, há estudos que demonstram que o raloxifeno de

forma aguda, induz vasodilatação endotélio-dependente e ativa diretamente síntese de óxido nítrico (NO) em células endoteliais, resultando em dilatação dos vasos sanguíneos (Simoncini et al, 2000). Em artérias coronarianas *in vitro* o raloxifeno e tamoxifeno agudo também promovem relaxamento, sugerindo que os efeitos agonistas destes SERMs estariam preservados em artérias coronárias (Figtre et al 2000). Além disso, a perfusão aguda de raloxifeno e tamoxifeno também induz relaxamento dose-dependente no leito vascular mesentérico (Tatchum-Talom, 2003).

Em relação as citocinas pró-inflamatórias, há estudos que relatam que o raloxifeno é capaz de inibir a expressão e a atividade *in vitro* de IL-6 e TNF- α (Taranta et al, 2002), sugerindo que esse fármaco pode, além de modular a atividade de células óssea, atuar também sobre as citocinas. Segundo Girasole (1992), o estrogênio também é capaz de inibir a produção de ambas citocinas IL-6 e TNF- α e parece que essa inibição do TNF- α , assim como a inibição de outras citocinas, como a IL-6, em modelos animais experimentais colabora na inibição da formação dos osteoclastos (Leng et al, 2002). A demonstração desses estudos reforça evidências de que os SERMs, assim como o estrogênio são capazes de interferir nos níveis de citocinas. Adicionalmente, os níveis de TNF- α e IL-6 aumentam em mulheres na fase pós-menopausa (Walsh 2001), logo a busca por TH poderão colaborar no controle destes marcadores inflamatórios, na osteoporose e em inúmeras DCV.

Poucos estudos abordam o efeito a longo prazo destes SERMs sobre a reatividade do leito mesentérico e sobre níveis de citocinas, que são sugeridas como marcadores de DCV em situação de deficiência estrogênica. Portanto este foi um dos motivos pelos quais decidimos realizar este estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com SERMs e do Estrogênio sobre a reatividade do leito mesentérico e influência destes tratamentos nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias: Interleucina -6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) em ratas ovariectomizadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos do tratamento com estrogênio, raloxifeno e tamoxifeno sobre o peso corporal e peso do útero;
- Investigar os efeitos do tratamento com estrogênio, raloxifeno e tamoxifeno sobre a reatividade vascular do leito mesentérico na presença de agentes vasoativos (Noradrenalina e Acetilcolina);
- Avaliar o papel do endotélio vascular sobre a resposta da Noradrenalina (NA) e Acetilcolina (Ach) no leito mesentérico isolado, por meio da avaliação da participação dos produtos das reações enzimáticas catalisadas pela óxido nítrico sintetase (NOS) e das ciclooxigenases encontradas no endotélio;
- Avaliar a participação da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em resposta a agentes vasoconstrictores (NA) em fêmeas ovariectomizadas quando comparados ao sham.
- Avaliar a influência do estrogênio, raloxifeno e tamoxifeno sobre os níveis séricos de citocinas pró inflamatórias (IL-6 e TNF- α)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fêmeas com peso corporal variando entre 190 a 200 g. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa nº 012/2008.

Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-24°C) e iluminação artificial de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa (FINEP). As gaiolas individuais permitiam livre acesso à ingestão de água e ração.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram separados em cinco grupos experimentais, sendo:

- 1) Fêmea Sham (n=07, SHAM)
- 2) Fêmea Ovariectomizada (n=07, OVX)
- 3) Fêmea Ovariectomizada Tratada com Estrogênio 0,5µg/kg/dia (n=07, EST)
- 4) Fêmea Ovariectomizada Tratada com Raloxifeno 2mg/Kg/dia (n=07, RAL)
- 5) Fêmea Ovariectomizada Tratada com Tamoxifeno 1mg/Kg/dia (n=07, TAM)

3.3 Protocolo Experimental

1º dia do protocolo: -Verificação do peso corporal

-Execução da técnica da ovariectomia nos animais, com exceção dos animais SHAM, em que foi realizada uma cirurgia fictícia;

7º e 14º dia do protocolo: Verificação do peso corporal.

21º dia do protocolo: Verificação do peso corporal. Início do tratamento dos animais com estrogênio, raloxifeno e tamoxifeno, os demais animais receberam placebo;

35º dia do protocolo: Verificação do peso corporal; cateterização da artéria mesentérica superior para realização da reatividade do leito vascular mesentérico (LVM) em resposta a noradrenalina e a acetilcolina; coleta da amostra de sangue; os animais foram sacrificados e o útero foi retirado para obtenção do peso úmido e, posteriormente, do peso seco.

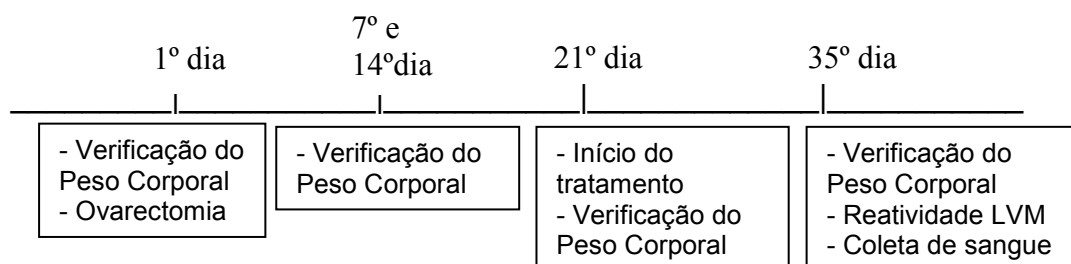


Figura 3: Organograma do Protocolo Experimental.

3.4. Ovariectomia

Após anestesia com Hidrato de Cloral 10% (Vetec Química Fina LTDA, RJ Brasil), os animais foram submetidos a uma incisão de 1 a 1,5cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários e ligadura da trompa uterina. Após a retirada dos ovários, foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. Ao final do procedimento os animais receberam 0,1ml do antibiótico Enrofloxacina 2,5% (Flotril®, Schering-Plough), por via intramuscular e foram recolocados em gaiolas individuais.

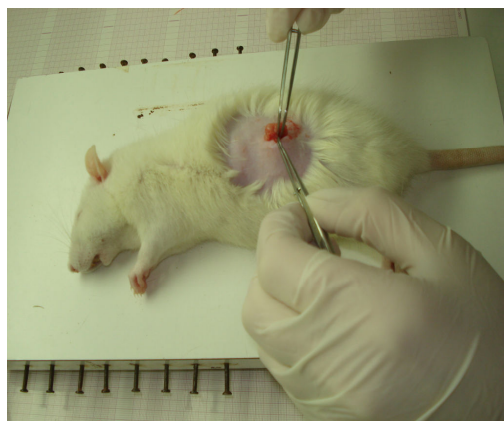


Figura 4: Fotografia da técnica de execução da ovariectomia.

3.5.Tratamento com SERMs

Dois grupos de fêmeas ovariectomizadas foram tratados por 14 dias com raloxifeno (Eli Lilly, Indianapolis, IN) e tamoxifeno (Galena, Brasil), por administração via oral da droga (gavagem), na forma de suspensão aquosa, numa dose diária de 2mg/kg de peso corporal e 1mg/Kg de peso corporal, respectivamente. O tratamento foi iniciado após 21 dias decorridos do processo de ovariectomia.

3.6 Tratamento com Estrogênio

Um grupo de fêmea ovariectomizada foi tratado por 14 dias com 17- β -estradiol (Sigma, St. Louis,USA), por via parenteral direta (subcutânea), dissolvido em óleo de amendoim, numa dose diária de 0,5 μ g/kg de peso corporal. O tratamento foi iniciado após 21 dias decorridos do processo de ovariectomia.

3.7. Reatividade do Leito Vascular Mesentérico

Foi utilizado o leito vascular mesentérico (LVM) isolado, segundo a descrição de Mc Gregor (1965). Após a anestesia com Hidrato de Cloral 10% (Vetec Química Fina LTDA, RJ Brasil), a artéria mesentérica superior foi isolada através de uma incisão abdominal com aproximadamente 6cm transversalmente e nesse vaso foi introduzida uma cânula de polietileno (PE50). Imediatamente o leito foi perfundido com solução nutritora, cuja composição consistia de: NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄.H₂O 1,17 mM; CaCl₂.2H₂O 1,6 mM; KH₂PO₄ 1,18 mM; NaHCO₃ 14,9 mM; EDTA 0,026 mM; Glicose 11,1 mM mantida por um banho Maria a 37°C e aerada constantemente através do borbulhamento da mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo o pH mantido a 7,5. Por meio de uma bomba rolete (Ismatec AS LaboratoriumStechnik, Switzerland), foi mantido um fluxo pulsátil de aproximadamente 4,0 ml/min e uma pressão de perfusão média variando de 30 \pm 5mm Hg. O leito como um todo foi cuidadosamente removido, liberado em sua borda dos intestinos, desprovido dos tecidos linfáticos aderentes e colocado num banho de

órgão isolado. A pressão de perfusão foi medida através de um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados foram digitalizados (Acqknowledge for Windows; Biopac Inc.) e armazenados em disco rígido do computador para análise. Após um período de estabilização (30 minutos) foram construídas curvas dose-resposta às substâncias vasoativas.

Foi utilizado um vasoconstritor, noradrenalina (NA), nas doses de 0,12 µg/ml a 2000 µg/ml de forma crescente, e um agonista vasodilatador dependente do endotélio, Acetilcolina (Ach), nas doses de $2,46 \times 10^{-8}$ a 2,46 mg/ml de forma crescente, na ausência e na presença de bloqueadores indometacina $2,8 \times 10^{-6}$ M (Sigma, St. Louis, USA) e N^ω-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) 10^{-4} M (Sigma, St. Louis, USA) adicionados simultaneamente na solução nutritora para bloqueio da ciclooxigenase e da óxido nítrico sintetase, respectivamente.

Para observar a participação da iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) no grupo ovariectomizado, foram realizados bloqueios individuais utilizando o Hemissulfato de Aminoguanidina 10^{-4} M (Sigma, St. Louis, USA), considerado um bloqueador específico da iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) e, o L-NAME 10^{-4} M (Sigma, St. Louis, USA), considerado um bloqueador inespecífico de NOS (óxido nítrico sintetase).

Para a obtenção da curva de relaxamento, a pressão de perfusão do LVM foi elevada com a adição de solução de noradrenalina 0,008mg/ml a solução nutritora, capaz de promover um aumento de 112 ± 5 mmHg no tônus vascular.

3.7.1. Protocolos do Estudo da Reatividade Vascular:

3.7.1.1. Reatividade vascular ao agente vasoconstrictor (NA) e ao agente vasodilatador (Ach)

Em primeiro lugar, o leito mesentérico era perfundido durante 30 minutos com solução nutritora para a obtenção da estabilização do registro. Em seguida eram aplicadas doses crescentes de NA, *in bolus*, para obtenção da curva dose-resposta ao agente vasoconstrictor.

Posteriormente, foi realizada a curva dose-resposta a Ach. Adicionou-se à solução nutritora NA (0,008mg/ml) para promover um aumento no tônus vascular, após a obtenção do platô de contração, doses crescentes de Ach eram administradas, *in bolus*, para se obter a curva dose-resposta a esse agente vasodilatador usado para o estudo da função endotelial.

3.7.1.2. Avaliação da participação do endotélio sobre a resposta vascular ao agente vasoconstrictor (NA) e ao agente vasodilatador (Ach),

O endotélio tem a habilidade de gerar respostas a alterações de fluxo e de pressão arterial que proporcionam a liberação de agentes vasodilatadores, como o NO, os derivados da ciclooxigenase (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), promovendo um relaxamento do vaso (Vanhoutte, 1996). Diante do bloqueio simultâneo de NO e das ciclooxigenases, o endotélio quando estimulado por agonistas, como por exemplo, a acetilcolina, ainda é capaz de promover o relaxamento em algumas preparações vasculares, propõe-se que esteja ocorrendo à liberação de um fator denominado EDHF (Taylor & Weston, 1988). A contribuição relativa de cada um desses mediadores de relaxamento derivado do endotélio é inversamente proporcional ao calibre do vaso, sendo o NO e a PGI_2 predominantes em vasos de condutância e o EDHF em vasos de resistência (Shimokawa et al., 1996). O leito mesentérico é considerado um grande contribuinte da resistência periférica total (Christensen & Mulvany, 1993).

Para avaliarmos a participação do endotélio vascular sobre os dois agentes utilizados, o leito mesentérico era perfundido durante 30 minutos com o duplo bloqueio da L-NAME + indometacina. Diante deste bloqueio simultâneo, era avaliada a participação do EDHF na reatividade vascular.

Primeiro repetimos a curva de NA na presença dos bloqueios para obtenção da curva dose-resposta ao agente vasoconstrictor. Em seguida, era adicionado à solução nutritora NA (0,008mg/ml) para promover o aumento no tônus vascular, após obtenção do platô de contração, doses crescentes de Ach eram administradas para se obter a curva dose-resposta a esse agente vasodilatador usado para o estudo da função endotelial.

3.7.1.3. Avaliação da participação da iNOS na reatividade vascular ao vasoconstrictor (NA) nas fêmeas ovariectomizadas

O NO é produto de reação da óxido nítrico sintetase (NOS) sobre substratos como L-arginina, sendo descritas três isoformas desta enzima: eNOS (constitutiva endotelial), nNOS (neuronal) e iNOS (induzida). As isoformas eNOS é constitutivamente expressa no endotélio vascular e, iNOS é expressa por células endoteliais e células do músculo liso quando expostas ao estímulo inflamatório (Nawate et al, 2005).

Neste protocolo, o leito mesentérico era perfundido durante 30 minutos, para estabilização do registro, em seguida eram aplicadas doses crescentes de NA para obtenção da curva dose-resposta. Em seguida, era adicionado à solução nutritora um bloqueador específico da iNOS (Aminoguanidina) que perfundia o leito mesentérico por 30 min para obtenção da estabilização do registro. Após este período, eram adicionadas doses crescentes de NA *in bolus* para obtenção da curva dose-resposta a esse agente vasoconstrictor, na presença do bloqueador específico de iNOS. Posteriormente, o leito era perfundido apenas com solução nutritora por 30 minutos para em seguida ser realizado o bloqueio com L-NAME. Neste momento, testávamos doses de NA para comparar com as doses administradas anteriores ao bloqueio, como forma de descartar qualquer interferência do bloqueio com

aminoguanidina. Assim, foi adicionada a solução nutritora o bloqueador inespecífico de NO (L-NAME), para em seguida aplicar doses crescentes de NA *in bolus*.

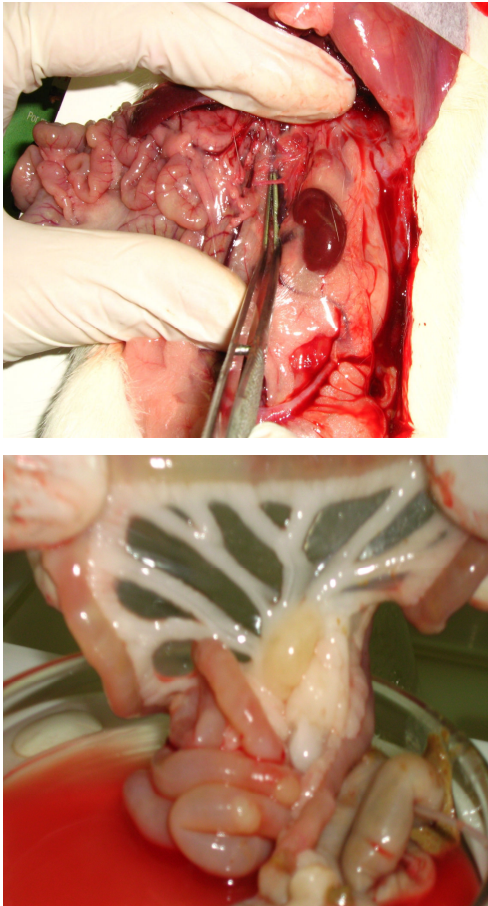


Figura 5: Em (A) fotografia da artéria mesentérica superior. Em (B) fotografia do leito mesentérico, após canulação da artéria mesentérica, sendo perfundido pela solução nutritora.

3.8. Estimativa da Massa do útero

Os animais foram sacrificados o útero foi isolado, lavado com solução fisiológica e o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e em seguida foi pesado. Foi dividido o peso do órgão úmido (mg) pelo peso corporal do rato (g), o que chamamos de razão do peso úmido (RPU). Para obtenção do peso seco destes órgãos, foram colocados em estufa a temperatura de 100°C por 24 horas para eliminação da água. Após este procedimento, os órgãos foram novamente pesados e a razão do peso seco (RPS) foi calculado dividindo o peso do órgão seco (mg) pelo peso corporal do rato (g).

3.9. Análise dos Níveis Séricos de IL-6 e TNF- α pela técnica ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Foram realizadas dosagens de citocinas pró inflamatórias (Interleucina 6 IL-6 e Fator de Necrose Tumoral Alfa- TNF α), sendo as determinações analíticas realizadas pelo método de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) por meio de Kits da Invitrogen-BioSource International em parceria com o Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES em amostras de soro dos animais. A técnica se baseia no método sanduíche. Amostras de soro armazenadas a -80°C foram previamente descongeladas e colocadas em placas individuais sensibilizadas, uma com anticorpo específico para IL-6 e outra para TNF- α de rato. As amostras, incluindo os padrões de conteúdos conhecidos IL-6 e TNF- α e espécimes controle foram pipetados para os diferentes poços, seguidos da adição de um segundo anticorpo monoclonal conjugado. Após esta etapa seguiu-se o período de incubação por 2 horas. Durante a primeira incubação a IL-6 e o TNF- α se ligam simultaneamente ao anticorpo imobilizado (captação) em um sítio, e ao segundo anticorpo conjugado (adicionado) em um segundo sítio. Após a remoção do excesso de segundo anticorpo por 4 sucessivas lavagens, a estreptavidina-peroxidase (enzima) foi adicionada. Esta se liga ao anticorpo conjugado para completar os quatro membros do sanduíche. Após uma nova incubação por 30 minutos e novamente 4 sucessivas lavagens para remoção de todas as enzimas não ligadas, uma solução substrato (cromógeno) foi adicionada e que reage com a

enzima para produção de cor (azul). A intensidade do produto colorido é diretamente proporcional à concentração das citocinas presentes.

3.10. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para todos os grupos estudados, comparando-se o grupo SHAM com os demais. A resposta máxima (Emax) e o log da concentração da droga requerida para produção de 50% da resposta máxima (pD2) foram determinados por meio de software (Graphpad Prism Software, San Diego California USA), com ANOVA uma- via seguido pelo teste de Tukey. Para as demais variáveis do estudo, foi aplicado o ANOVA uma- via seguido pelo teste de Fisher's para múltiplas comparações.

O procedimento do ELISA foi realizado para duplicatas das amostras e padrões, sendo realizada a média entre as absorbâncias a partir da leitura realizada através do aparelho Dynex Technologies – analisador automático de ELISA, em comprimento de onda de 450nm. Para correções de diluições sofridas durante o procedimento, as médias foram multiplicadas por 2, obtendo-se o valor real da absorbância. As concentrações das citocinas foram calculadas a partir da absorbância real de acordo com o modelo matemático abaixo:

Sendo para IL-6 ($R^2 = 0,996$; SE = 0,038; P = 10,10%) a equação de estimativa da

concentração descrita pela fórmula:
$$conc = -\frac{\ln\left(\frac{1,9944 - abs}{1,9072}\right)}{0,0011}$$

Já para TNF- α ($R^2 = 0,995$; SE = 0,045; P = 5,99%) a equação de estimativa da

concentração descrita pela fórmula:
$$conc = -\frac{\ln\left(\frac{1,8473 - abs}{1,6231}\right)}{0,0049}$$

Os níveis de significância estabelecidos foram $p < 0,05$.

4 RESULTADOS:

4.1. Verificação do peso corporal inicial e final (gramas) e razão do peso do útero úmido e seco (mg) pelo peso corporal do animal (g):

Na tabela 1 e figura 6 está representado o peso corporal dos animais experimentais que foi medido ao longo de 35 dias do protocolo. No início do estudo não há diferença significativa do peso corporal entre os grupos. No 35º dia, comparando fêmeas ovariectomizadas tratadas com raloxifeno e estrogênio com fêmeas sham, não houve diferença significativa. Já no grupo tamoxifeno, foi encontrado um menor ganho de peso corporal quando comparado ao sham e aos demais grupos. Nas fêmeas ovariectomizadas houve aumento significativo no peso corporal final quando comparado aos outros grupos presentes no estudo.

Na tabela 1 a eficácia da ovariectomia pode ser comprovada pela redução significativa dos valores do peso do útero úmido (figura 7) e do peso do útero seco (figura 8), nas fêmeas ovariectomizadas quando comparados aos demais grupos. O tratamento com estrogênio reverteu essa redução, retornando a valores semelhantes ao grupo sham. O tratamento com raloxifeno e tamoxifeno reverteu, parcialmente, essa redução, quando comparado ao grupo sham, porém teve aumento significativo no peso do útero (úmido e seco), quando comparado ao grupo ovariectomizado.

Tabela 1: Peso Corporal (PC gramas), Peso do útero úmido (PU), Peso do útero seco (PS) / peso corporal (PC mg/g) nos grupos: SHAM, ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com estrogênio (EST), raloxifeno (RAL) e tamoxifeno (TAM)

GRUPOS	Peso Inicial	Peso Final	PU/PC útero	PS/PC útero
SHAM	205 ± 3	247 ± 1	2,1 ± 0,1	0,33 ± 0,03
OVX	202 ± 5	298 ± 2 ^{**#\$\$++}	0,4 ± 0,1 ^{**#\$\$++}	0,08 ± 0,01 ^{**#\$\$++}
EST	202 ± 4	260 ± 4	2,0 ± 0,1	0,32 ± 0,04
RAL	202 ± 4	255 ± 2	1,3 ± 0,1 ^{###}	0,24 ± 0,02 ^{###}
TAM	198 ± 3	213 ± 7 ^{*ΔΔ## \$\$}	1,5 ± 0,1 ^{###}	0,26 ± 0,01 ^{###}

Os valores foram apresentados com média ± EPM. ^{**}p<0.01 e ^{*}p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM; ^{ΔΔ}p<0,01 comparado ao CAST; ^{##}p< 0,01 comparado ao EST; ^{\$\$}p<0,01 comparado ao RAL; ⁺⁺P<0,01 comparado ao TAM

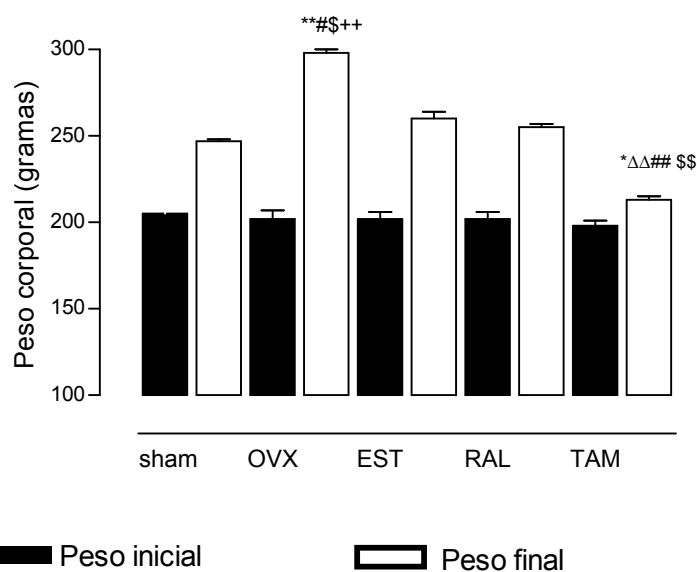


Figura 6: Representação do peso corporal inicial e do peso corporal final (gramas) dos grupos sham, ovariectomizada (OVX), ovariectomizada tratada com estrogênio (EST), tratada com raloxifeno (RAL) e tratada com tamoxifeno (TAM). ^{**}p<0.01 e ^{*}p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM; ^{ΔΔ}p<0,01 comparado ao CAST; ^{##}p< 0,01 comparado ao EST; ^{\$\$}p<0,01 comparado ao RAL; ⁺⁺P<0,01 comparado ao TAM.

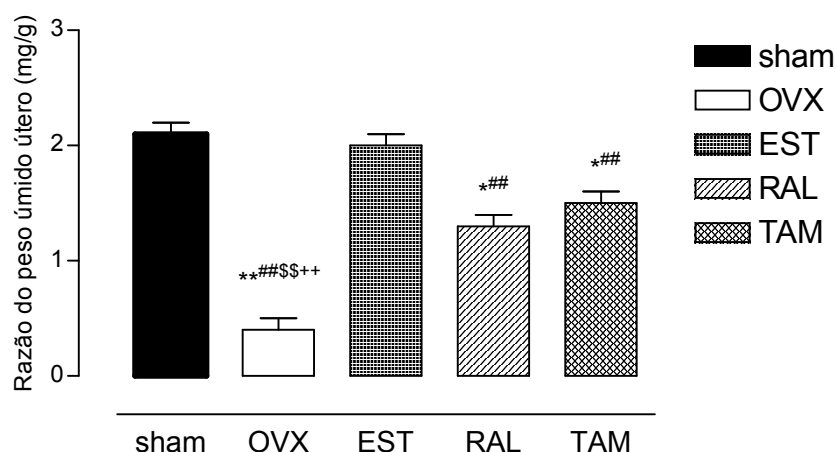


Figura 7: Valores da razão do peso do útero úmido pelo peso corporal do animal (mg/g) dos grupos sham, ovariectomizada (OVX), ovariectomizada tratada com estrogênio (EST), tratada com raloxifeno (RAL) e tratada com tamoxifeno (TAM). ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo SHAM; ## $p < 0.01$ e # $p < 0.05$ comparado ao EST; \$\$ $p < 0.01$ comparado ao RAL; ++ $p < 0.01$ comparado ao TAM.

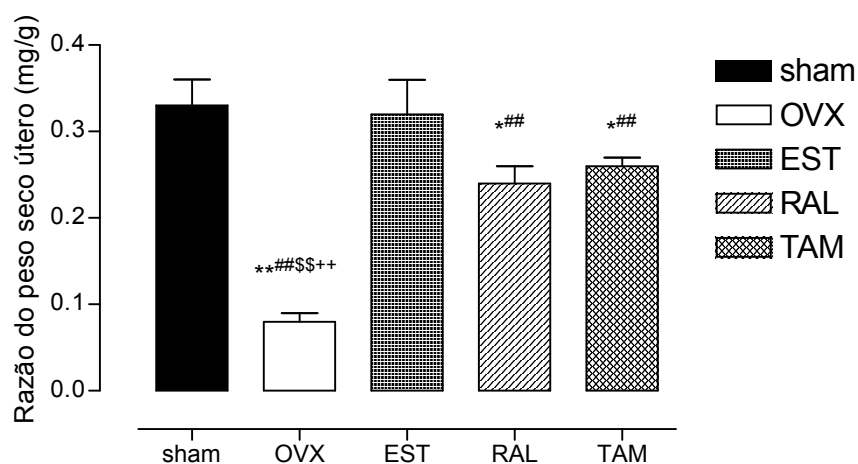


Figura 8: Valores da razão do peso do útero seco pelo peso corporal do animal (mg/g) dos grupos sham, ovariectomizada (OVX), ovariectomizada tratada com estrogênio (EST), tratada com raloxifeno (RAL) e tratada com tamoxifeno (TAM). ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo SHAM; ## $p < 0.01$ e # $p < 0.05$ comparado ao EST; \$\$ $p < 0.01$ comparado ao RAL; ++ $p < 0.01$ comparado ao TAM.

4.2. Reatividade Vascular:

Em relação aos agentes vasoativos atuando no leito mesentérico, a resposta mediada pela Acetilcolina (Ach) está representada na figura 9 e tabela 2, em que se observa um relaxamento dependente da concentração da droga e, um menor relaxamento no grupo das fêmeas ovariectomizadas. Em relação ao pD_2 não houve diferença significativa nas ovariectomizadas em relação aos demais grupos.

Quando foi adicionado à solução nutritiva o bloqueador de ciclooxigenase e o inibidor da produção de NO, indometacina e L-NAME, respectivamente, o relaxamento máximo foi reduzido ainda mais no grupo das fêmeas ovariectomizadas, quando comparado as fêmeas tratadas com estrogênio e com SERMs. O tratamento com as referidas drogas normalizaram essa alteração.

Em relação à curva dose-resposta a Noradrenalina (NA) que está representada na tabela 3 e figura 10 no leito vascular mesentérico, observa-se que a ovariectomia produziu uma redução significativa na resposta máxima (E_{max}), mas não alterou pD_2 quando comparado ao grupo sham e aos demais grupos que receberam tratamento. Após 14 dias de tratamento com SERMs e o estrogênio, a capacidade de resposta à NA foi restaurada ao nível do grupo sham.

Ao adicionar conjuntamente indometacina e o L-NAME na solução nutritiva, a alteração a resposta ao agente vasoconstrictor, anteriormente, presente no grupo ovariectomizado, desapareceu, ou seja, na presença de bloqueadores a resposta a NA retornou a valores semelhantes do grupo sham.

Tabela 2: Valor da Resposta Máxima (Emáx) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico em resposta a injeção crescentes de Acetilcolina (Ach) *in bolus* nos grupos Fêmea Sham (SHAM), Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas Tratadas com Raloxifeno (RAL), Tamoxifeno (TAM) e Estrogênio (EST) na ausência de bloqueadores e na presença de Indometacina (2,8 x 10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴M):

	Emáx	pD ₂	Emáx	pD ₂
GRUPOS	Ausência dos bloqueadores		Presença dos bloqueadores	
SHAM	50,6 ± 3,3	3,2 ± 0,3	47,9 ± 3,6	2,9 ± 0,3
OVX	41,3 ± 1,9 ^{**##\$\$++}	3,7 ± 0,2	35,3 ± 4,6 ^{**##\$\$++}	3,2 ± 0,6
EST	57,4 ± 5,1	2,8 ± 0,4	58,4 ± 6,3	3,1 ± 1,2
RAL	63 ± 4,5	2,2 ± 2,9	56,4 ± 7,1	2,3 ± 1,1
TAM	58,8 ± 5,1	3,4 ± 0,4	52,1 ± 2,7	3,5 ± 0,2

Os valores foram apresentados como média ± EPM **p<0,01 comparado ao SHAM; ##p<0,01 comparado ao EST; \$\$p<0,01 comparado ao RAL; ++ p<0,01 comparado ao TAM

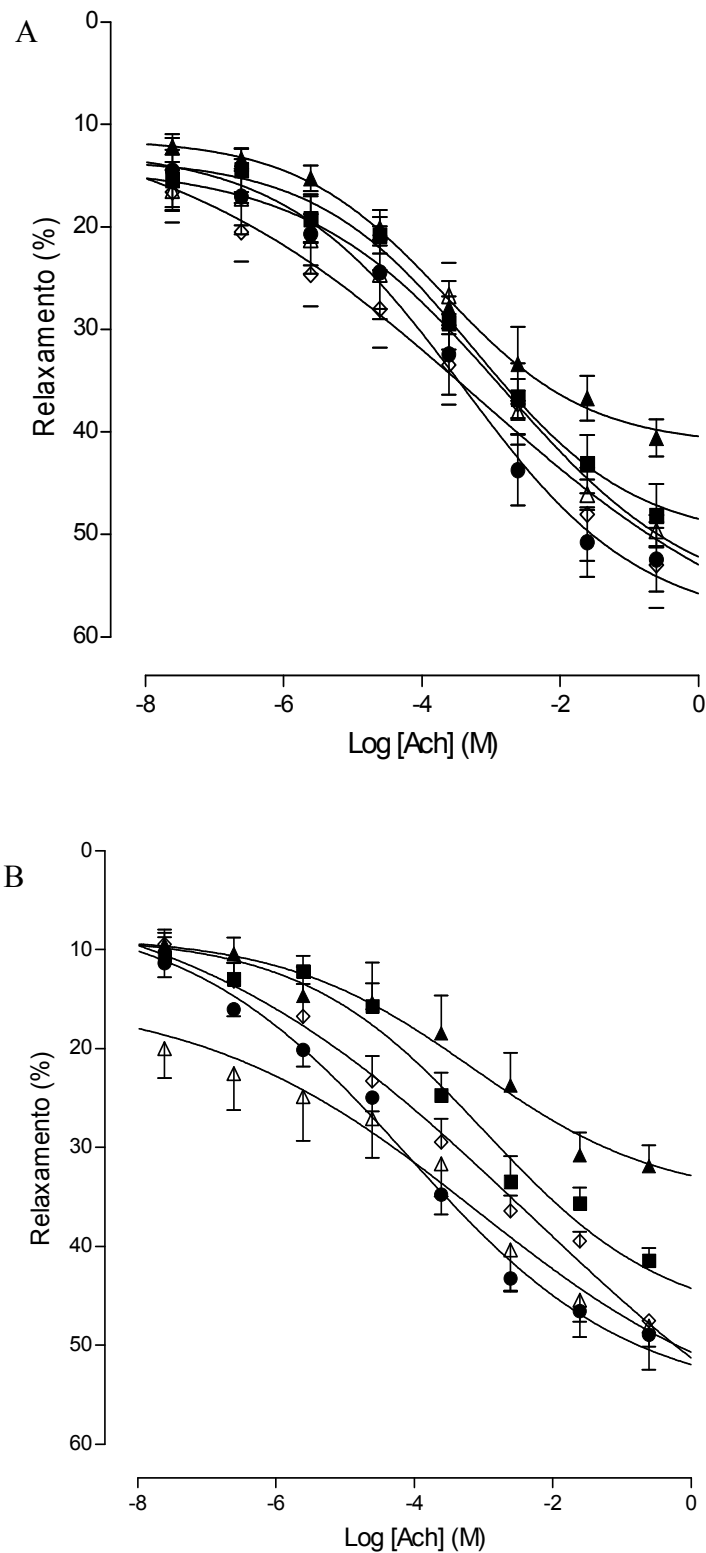


Figura 9: Curva dose-resposta a acetilcolina (ACh) induzindo vasorelaxamento no leito mesentérico nos grupos (■) Sham, (▲) OVX, (△) Estrogênio, (◇) Raloxifeno e (●) Tamoxifeno na ausência (A) e na presença dos bloqueadores Indometacina ($2,8 \times 10^{-6}$ M) e L-NAME (10^{-4} M) (B)

Tabela 3: Valor da Resposta Máxima (Emáx) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico em resposta a injeção crescentes de Noradrenalina (NA) *in bolus* nos grupos Fêmea Sham (SHAM), Fêmea Ovariectomizada (OVX), Fêmeas Ovariectomizadas Tratadas com Raloxifeno (RAL), Tamoxifeno (TAM) e Estrogênio (EST) na ausência de bloqueadores e na presença de Indometacina (2,8 x 10⁻⁶ M) e L-NAME (10⁻⁴ M):

	Emáx	pD ₂	Emáx	pD ₂
GRUPOS	Ausência dos bloqueadores		Presença dos bloqueadores	
SHAM	121,1 ± 4,7	0,7 ± 0,06	113,7 ± 4,2	0,7 ± 0,06
OVX	87,9 ± 5,6 ^{***\$++}	0,7 ± 0,10	112,3 ± 4,9	0,6 ± 0,07
EST	143,7 ± 10,8	0,6 ± 0,13	113,2 ± 7,7	0,9 ± 0,1
RAL	118,8 ± 9,4	0,8 ± 0,12	90,6 ± 4,4	0,7 ± 0,06
TAM	131,4 ± 6,7	0,6 ± 0,09	98 ± 4,4	0,7 ± 0,07

Os valores foram apresentados como média ± EPM *p<0,05 comparado ao SHAM; ^{##}p<0,01 comparado ao EST; ^{\$}p<0,05 comparado ao RAL; ⁺⁺ p<0,01 comparado ao TAM

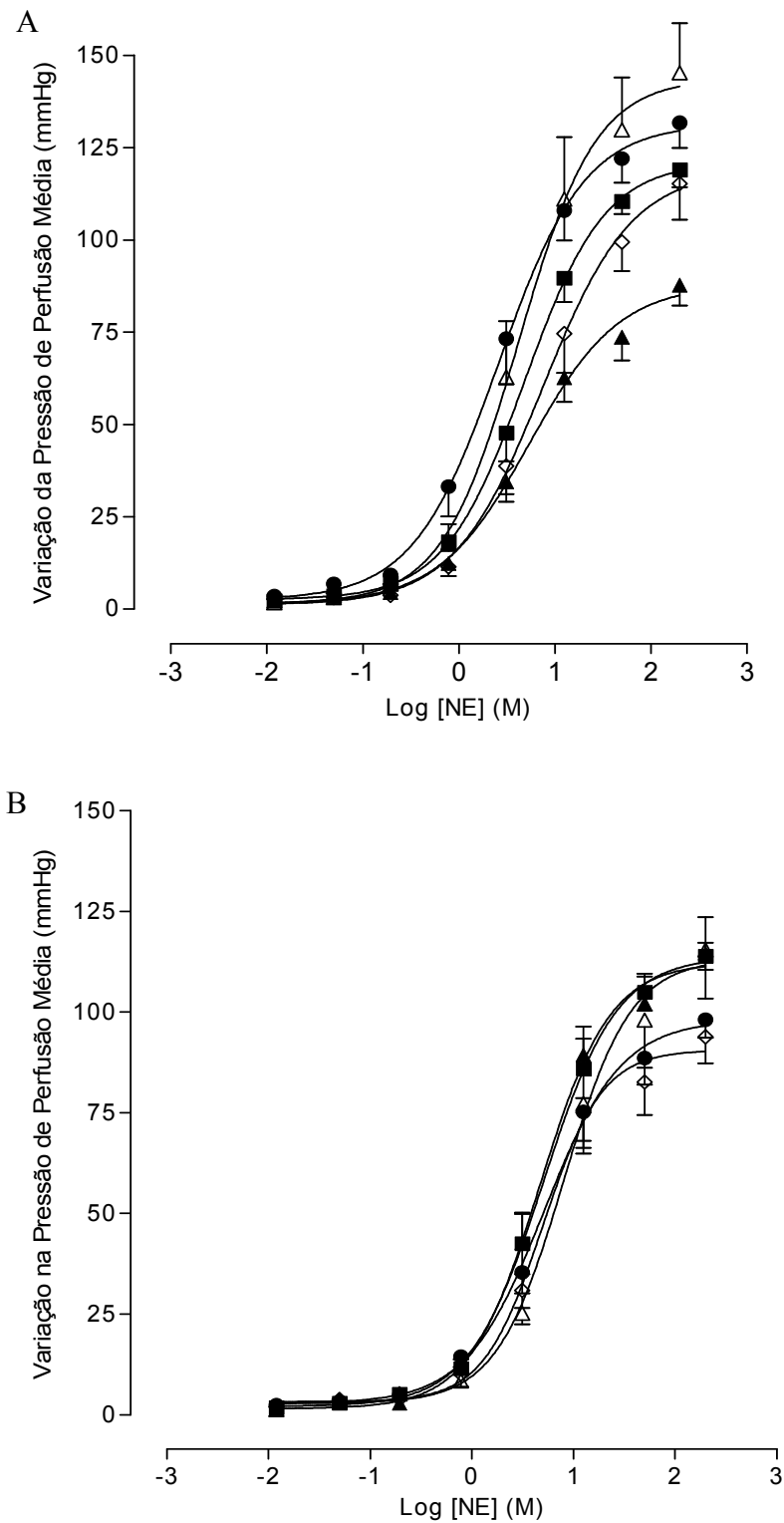


Figura 10: Curva dose-resposta a noradrenalina (NA) induzindo vasoconstrição no leito mesentérico nos grupos (■) Sham, (▲) OVX, (Δ) Estrogênio, (◇) Raloxifeno e (●) Tamoxifeno na ausência (A) e na presença de bloqueadores Indometacina ($2,8 \times 10^{-6}$ M) e L-NAME (10^{-4} M) (B).

4.2.1. Avaliação da participação da iNOS na reatividade vascular ao vasoconstrictor (NA) nas fêmeas ovariectomizadas:

Mediante essa resposta atenuada nas fêmeas ovariectomizadas em resposta a NA quando comparada ao sham, era necessário conhecer o mecanismo e/ou o participante que poderia estar auxiliando nessa resposta. Nos grupos sham e ovariectomizado foi realizada uma curva dose-resposta ao agente vasoconstrictor (NA) na ausência de bloqueadores (fase pre) e na presença de bloqueador específico para iNOS (aminoguanidina) e de bloqueador inespecífico para NOS (L-NAME) que pode ser observado na tabela 4 e na figura 11.

Na presença da aminoguanidina, a resposta a NA nas fêmeas ovariectomizada, quando comparada a resposta na ausência de bloqueadores é significativamente aumentada, o mesmo não ocorre com o grupo sham.

Após um período de estabilização (30 min), no qual o leito era somente perfundido com solução nutritiva, posteriormente, foi realizado o bloqueio inespecífico (L-NAME), no qual houve um aumento significativo em ambos os grupos, porém sendo mais expressivo nas fêmeas sham.

Tabela 4: Valor da Resposta Máxima (Emáx) e do log da concentração da droga para produzir 50% da resposta máxima (pD₂) no leito mesentérico em resposta a injeção crescentes de Noradrenalina (NOR) *in bolus* nos grupos (a) Fêmea Sham (SHAM), (b) Fêmea Ovariectomizada (OVX), na ausência de bloqueadores (Pre) e na presença de Aminoguanidina (AG) (10⁻⁴M) e L-NAME (10⁻⁴M)

GRUPOS	Pre	Aminoguanidina	L-NAME
SHAM (E _{max})	115,1 ± 4,5	107,4 ± 2,9	175,0 ± 5,9
OVX (E _{max})	62,1 ± 4,1 ^{□□}	93,84 ± 5,3	125,2 ± 8,3 ^{□□}
SHAM (pD ₂)	2,5 ± 0,07	2,9 ± 0,04	2,6 ± 0,06
OVX (pD ₂)	4,8 ± 0,12	5,2 ± 0,09	5,6 ± 0,11

Os valores foram expressos com média ± EPM. ^{□□}p<0,001 quando comparado ao sham na fase sem bloqueio (pre). ^{□□}p<0,001 quando comparado ao sham na presença de L-NAME.

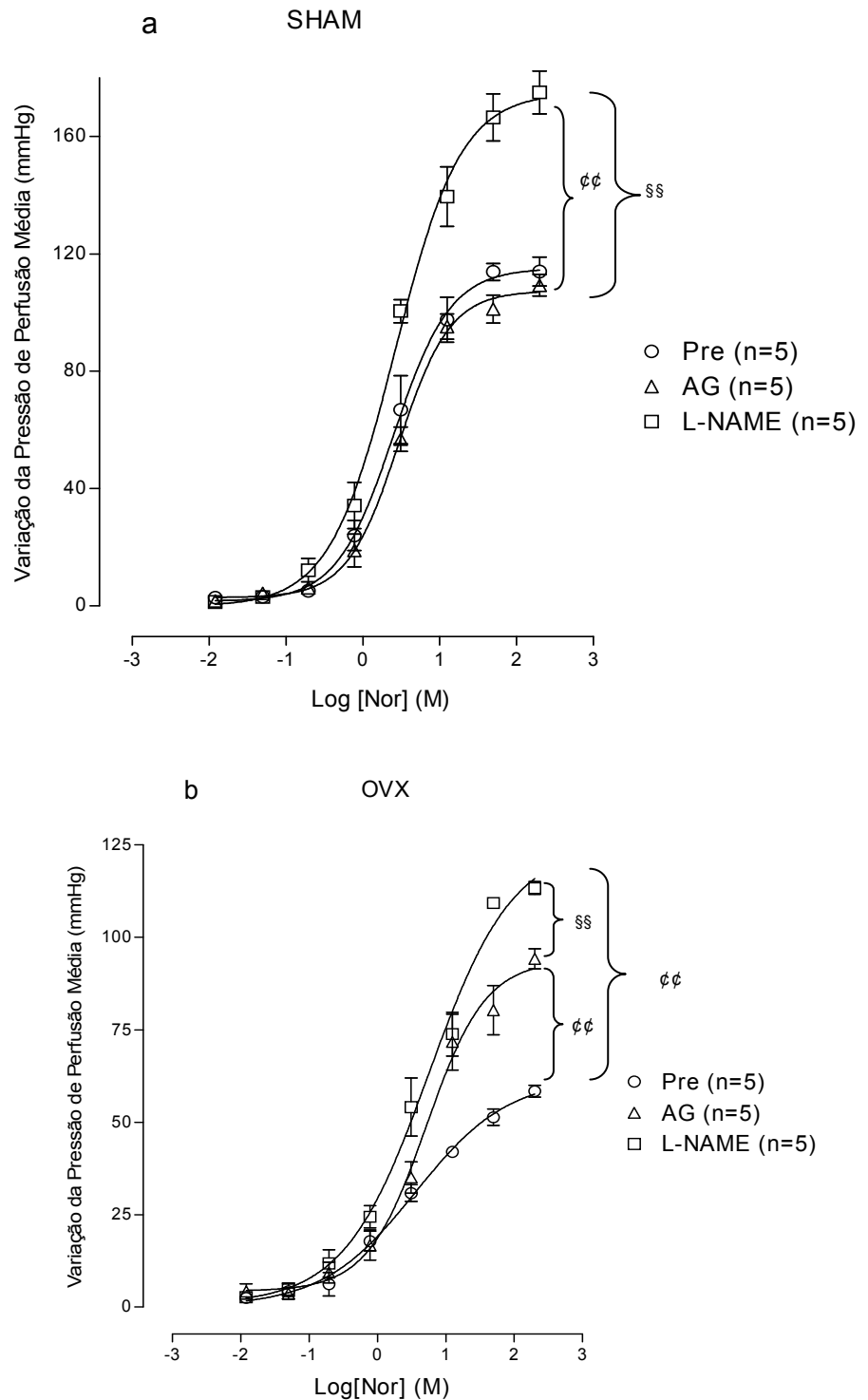


Figura 11: Curva dose-resposta a noradrenalina (NA) no leito mesentérico nos grupos Sham (A) e OVX (B) na ausência de bloqueadores (pre), na presença de um bloqueador específico de iNOS (AG) e na presença de um bloqueador inespecífico da NOS (L-NAME). §§ $p < 0,01$ quando comparado a fase sem bloqueio (pre) dentro do mesmo grupo. §§§ $p < 0,01$ quando comparado a presença de aminoguanidina dentro do mesmo grupo.

4.3 Análise dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α):

Na tabela 5 e figura 12 estão demonstrados os resultados referentes às dosagens das citocinas pró-inflamatórias no soro das fêmeas do grupo sham, grupo ovariectomizada e ovariectomizadas tratadas com estrogênio, raloxifeno e tamoxifeno. As dosagens foram realizadas pelo método de ELISA descrito anteriormente.

Observa-se um aumento significativo nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) nas fêmeas ovariectomizadas quando comparado as fêmeas do grupo sham. Os tratamentos com SERMs e estrogênio foram capazes de diminuir esses níveis próximos aos valores do grupo sham. Logo, o tratamento dos animais ovariectomizados foi efetivo no controle dos níveis séricos das referidas citocinas desse estudo.

Tabela 5: Marcadores da Inflamação. O impacto da Terapia Hormonal nas fêmeas sham, ovariectomizadas(OVX), ovariectomizadas tratadas com Estrogênio (EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM).

GRUPOS	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SHAM	19,3 \pm 6	20,3 \pm 2
OVX	32,8 \pm 7 ^{***\$\$+}	31,0 \pm 5 ^{***\$\$++}
EST	20,0 \pm 7	17,6 \pm 2
RAL	17,4 \pm 5	19,6 \pm 2
TAM	22,0 \pm 2	12,7 \pm 3

Os valores foram apresentados com media \pm EPM. **p<0,01 e *p<0,05 quando comparado ao grupo SHAM; ##p<0,01 comparado ao EST; \$\$p<0,01 comparado ao RAL; ++p<0,01 e +p<0,05 quando comparados ao TAM

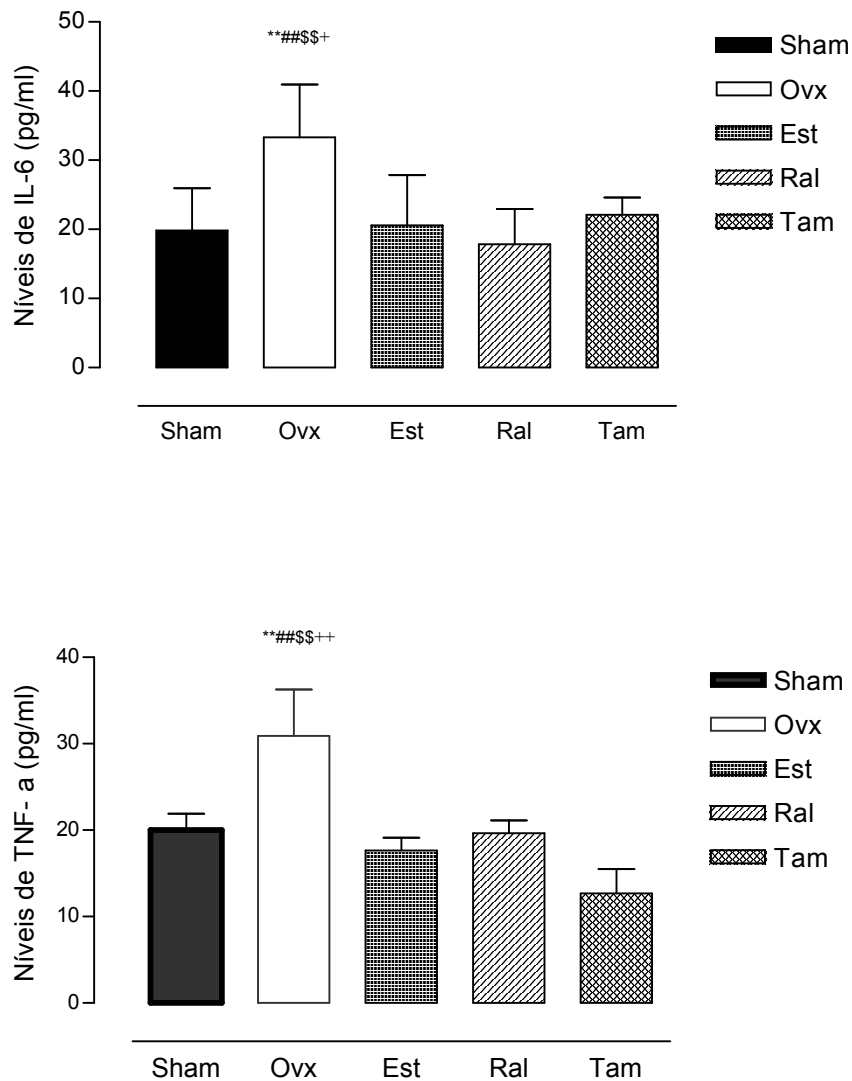


Figura 12: Apresentação dos níveis séricos de IL-6 e TNF- α nos grupos sham, Ovariectomizada (OVX), Estrogênio(EST), Raloxifeno (RAL) e Tamoxifeno (TAM). ** $p < 0.01$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SHAM; ## $p < 0,01$ comparado ao EST; \$\$ $p < 0,01$ comparado ao RAL; ++ $p < 0.01$ e + $p < 0,05$ comparados ao TAM

5. Discussão:

Neste estudo avaliamos o efeito do tratamento crônico com SERMs e estrogênio sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e a reatividade vascular do leito mesentérico de ratas ovariectomizadas. Nestas foi observada uma menor resposta vasoconstrictora a noradrenalina em relação aos demais grupos, no qual essa resposta mais atenuada pode estar relacionada ao fato dos animais ovariectomizados liberarem mais NO pela ação da iNOS, resultado este que pôde ser comprovado pelo bloqueio específico da iNOS pela aminoguanidina. Além disso, o grupo ovariectomizado apresentou menor resposta vasodilatadora na curva-dose resposta a acetilcolina, quando comparado aos demais grupos, e mesmo após o bloqueio das enzimas ciclooxigenase (Indometacina) e NOS (L-NAME) o menor relaxamento ainda persiste. Isso, possivelmente, se deve a menor produção/liberação do Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF) nestas fêmeas com deficiência de estrogênio. Adicionalmente, os animais ovariectomizados apresentaram níveis séricos aumentados de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α), dados que podem ser relacionados com o possível prejuízo encontrado neste grupo em relação a resposta vascular aos agentes vasoativos. Os tratamentos utilizados foram capazes de normalizarem tanto as alterações referentes a reatividade vascular, quanto os elevados níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias encontrados em fêmeas ovariectomizadas.

As alterações encontradas nas ovariectomizadas podem ser relacionadas ao menor nível de estrogênio neste grupo. A deficiência de estrogênio pôde ser comprovada pelo menor peso do útero das fêmeas ovariectomizadas quando comparado ao sham (tanto para o peso desse órgão úmido e seco quanto para a relação com o peso corporal). O tratamento com estrogênio nas ratas ovariectomizadas normaliza o peso do útero. Este resultado demonstra um efeito proliferativo do estrogênio nesse órgão que é relatado na literatura (Nash et al., 1989). Já os tratamentos com SERMs reverteram parcialmente esta alteração. Observamos que o raloxifeno exerceu um efeito agonista parcial, o que é consistente com dados na literatura que sugerem que as propriedades agonista ou antagonistas dependem da função ovariana. Quando administrado em fêmeas intactas o útero sofre uma atrofia (Erlandsson et al 2002), mas quando administrado em fêmeas ovariectomizadas, é observado um efeito

agonista parcial no útero desses animais (Sato et al 1996). Apesar do tamoxifeno exercer papel de agonista no útero (Dutertre & Smith, 2000), esta droga aumentou parcialmente o peso deste órgão, provavelmente, isso pode estar relacionado a dose administrada e ao tempo de tratamento utilizados no presente estudo. Entretanto, estudo em humanos foi constatado que mulheres que utilizam o tamoxifeno por um longo período, aumentam o risco de desenvolverem câncer de endométrio (Cosman & Lindsay, 1999).

Em relação ao peso corporal há um aumento do peso das fêmeas ovariectomizadas corroborando com dados da literatura (Yoshitake et al., 1999; Kloosterboer & Ederveen 2003). Após iniciarmos o tratamento com SERMs e estrogênio, os animais ovariectomizados tratados com estas drogas apresentaram peso corporal final semelhante ao grupo sham, com exceção do grupo tratado com tamoxifeno que obteve um menor ganho de peso. Esse dado está de acordo com a literatura, como o estudo proposto por Hozumi e colaboradores 2005, em que foi demonstrado que o tratamento com tamoxifeno em ratas ovariectomizadas, reduziu a ingestão de comida e o ganho de tecido adiposo nesses animais. Além disso, ao avaliar os níveis de leptina estes estavam diminuídos. A leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos, que tem sido relatado como um importante fator hormonal e, ao nível hipotalâmico é essencial para a regulação do peso corporal através da alteração da ingestão de alimento e da organização da utilização de energia (Riccioni et al, 2003).

O papel da inflamação na iniciação e progressão de doenças é cada vez mais reconhecido. Logo, este foi um dos motivos de termos avaliado no nosso estudo, a concentração plasmáticas de citocinas. Além disso, estudos epidemiológicos demonstraram um aumento no risco vascular associado com o aumento de níveis basais de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α (Ridker et. al, 2000). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias funcionam como biomarcadores para DCV, que aumentam durante o avançar da idade (Bruunsgaard, 2006) e deficiência de estrogênio.

Nos nossos resultados apresentados, observamos níveis séricos aumentados de TNF- α e IL-6 em ratas ovariectomizadas quando comparado aos demais grupos. Poderíamos especular que estas citocinas possam estar associadas com a alteração

da resposta vascular do leito mesentérico em fêmeas ovariectomizadas. A alteração ocorreu tanto na resposta dos vasoconstrictores quanto nos vasodilatadores, quando comparada aos demais grupos. Os resultados também mostraram que o tratamento com estrogênio e SERMs foram capazes de normalizarem as alterações vasculares das ratas ovariectomizadas, assim como diminuir os níveis séricos de IL-6 e TNF- α , demonstrando que os tratamentos foram eficazes.

Citocinas pró-inflamatórias também estão relacionadas com a osteoporose e, a diminuição da massa óssea pode ser causada pela redução nos níveis de estrogênio, colaborando para a osteoporose. O processo de remodelamento é controlado pelo balanço da atividade dos osteoblastos e osteoclastos. A IL-6 é um importante estimulador da diferenciação de osteoclastos, maturação e ativação de TNF- α (Gianni et al, 2004). As citocinas pró-inflamatórias podem induzir apoptose dos osteoblastos via ativação de iNOS (Koh et al, 2005) indicando que os osteoclastos podem estar mais envolvidos com as citocinas quando comparado aos osteoblastos.

O raloxifeno, um fármaco muito utilizado na prática clínica, atua no tratamento e prevenção da osteoporose na fase pós-menopausa, agindo como agonista no osso. Adicionalmente, há estudos que relatam que o raloxifeno inibe *in vitro* a atividade e expressão do TNF- α e IL-6 (Taranta et al 2002), assim com *in vivo*, em que Gianni e colaboradores 2004, demonstraram em mulheres que o raloxifeno em diferentes tempos de tratamento, foi capaz de diminuir os níveis de IL-6 e TNF- α . Estes estudos sugerem que a modulação da atividade das células presentes no osso, pode ser em parte, pela expressão dessas citocinas e, que o tratamento com raloxifeno tanto *in vivo* e *in vitro* foram capazes de diminuir os níveis de IL-6 e TNF- α .

Estudos demonstram que o estrogênio também é capaz de diminuir os níveis de TNF- α , como o realizado por Arenas e colaboradores 2005, em que demonstraram que animais ovariectomizados apresentavam níveis elevados de TNF- α , e que o tratamento com estrogênio era capaz de diminuir esses níveis. Da mesma forma, outros estudos, porém em humanos, demonstraram que a retirada dos estrogênios pode aumentar a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e

que a administração de estrogênios pode inibir sua expressão e liberação (Morishita et al, 1999). Entretanto, um estudo realizado em mulheres, demonstra um efeito dose-dependente. Neste estudo, foi avaliado baixas e altas dose de estrogênio equino conjugado, no qual foi observado elevação de níveis de IL-6 em pacientes que fizeram terapia com altas doses e, nenhuma alteração em mulheres que utilizaram baixas doses (Wakatsuki et al, 2003).

Em relação ao tratamento com tamoxifeno, nenhum estudo referente ao controle dos níveis de citocinas foi encontrado no período pesquisado do decorrer deste estudo. Logo, nosso estudo é o primeiro a abordar a participação desta droga em relação aos fatores pró-inflamatórios.

Outros fatores podem também estar relacionados ao aumento nos níveis de citocinas, como a deficiência nos níveis estrogênicos, pois a menopausa é considerada um fator de risco bem estabelecido para doenças cardiovasculares (Stevenson, 2000).

É bem conhecido que a disfunção do endotélio vascular participa da gênese de DCV, incluindo as que ocorrem na fase pós-menopausa. Vários fatores podem ser responsáveis pela disfunção. O endotélio vascular é particularmente afetado pela ação do TNF- α . Após a estimulação pelas citocinas, as células endoteliais sofrem alterações morfológicas resultando num quadro pró-trombótico e pró-inflamatório. Em um estudo *in vivo* que simulava o modelo de menopausa, os níveis aumentados de TNF- α eram associados a disfunção endotelial (Arenas et al, 2005).

Antes de discutirmos os nossos resultados sobre reatividade vascular, faz se necessário uma breve descrição da função fisiológica do endotélio e da consequencia de sua disfunção, como se segue.

Sob condições normais o endotélio mantém um efeito vasodilatador, antitrombótica e anti-inflamatório. Além disso, essas células desempenham um papel fundamental na circulação através da síntese de vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Durante o

processo de disfunção endotelial, a síntese/bioatividade de vasodilatadores é reduzida favorecendo o aumento de vasoconstritores derivados do endotélio (endotelina, Tromboxano A₂, AII). O NO é produzido durante a conversão NOS-mediada pela L-arginine convertida a L-citrulina. Duas isoformas da NOS são relevantes para efeitos antiinflamatórios, Óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e Óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). eNOS é Ca²⁺-dependente e produz pequenas quantidades de NO. Uma das isoformas da NOS, é a iNOS, que normalmente é indetectáveis em tecido vascular saudável, mas é expressa por leucócitos em resposta citocinas. As citocinas induzem a expressão de iNOS, levando as células endoteliais a produzirem maior NO (Vila & Salaices, 2005). Outro fator derivado do endotélio são as prostaciclina PGI₂, que são anti-agregadores plaquetários e um vasodilatador com efeitos benéficos na circulação. PGI₂ é produzido a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase (COX)-1 e COX-2. Outro fator é o EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio) que possui predominância em vasos de resistência (Shimokawa et al., 1996), como o leito mesentérico em estudo, sendo o EDHF um grande contribuinte da resistência periférica total (Christensen & Mulvany, 1993).

Muitos estudos demonstram o efeito direto do TNF- α sobre eNOS, que promove down-regulation da expressão desta enzima e, conseqüentemente diminuição na produção de NO em diversas vasculaturas (Goodwin et al, 2007). O ciclo citrulina/NO é regulado pela argininosuccinato sintase (AAS) demonstrado na figura 13. O NO é sintetizado pela conversão de L-arginina em L-citrulina mediado pela eNOS e catalisado pela AAS. Goodwin e colaboradores 2007, demonstraram que TNF- α diminui a expressão mRNA eNOS e da proteína AAS em células endoteliais aórticas e diretamente reduzindo a produção de NO.

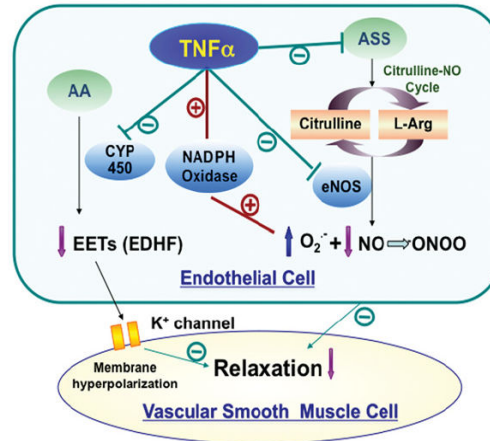


Figura 13: Envolvimento do TNF- α na disfunção endotelial. AA: ácido araquidônico (Zhang et al, 2009)

Em relação aos dados da curva dose-resposta de noradrenalina, na qual a vasoconstrição é primariamente mediada por receptores α -adrenérgicos, observou-se uma resposta vasoconstrictora mais atenuada no grupo ovariectomizado quando comparado aos demais grupos. Ao realizar o bloqueio com L-NAME e indometacina, a resposta do grupo ovariectomizado tornou-se semelhante aos demais grupos. Portanto, qual seria o fator responsável pela essa atenuação da resposta nas fêmeas ovariectomizadas? Foi realizado um bloqueio inespecífico NOS utilizando L-NAME e um bloqueio específico da iNOS utilizando aminoguanidina. No bloqueio utilizando L-NAME houve aumento na vasoconstrição em resposta à NA em ambos os grupo, sugerindo que NO poderia ser um dos maiores responsáveis na manutenção de uma menor resposta no grupo ovariectomizado, entretanto era necessário conhecer qual tipo de NOS estava envolvida nesse processo. Foi realizado um bloqueio com inibidor específico para iNOS (aminoguanidina), onde foi observado um reposta vasoconstrictora a NA significativamente aumentada nas fêmeas ovariectomizadas quando comparado ao sham, evidenciando que o grupo ovariectomizado libera mais NO derivado iNOS quando comparado ao grupo sham.

Esses dados estão de acordo com outros estudos, como o proposto por Nawate e colaboradores 2005, ao realizar curva dose-resposta com fenilefrina (vasoconstritor agonista α_1 -adrenérgico) em fêmeas Wistar ovariectomizadas, observou-se uma diminuição na resposta vasoconstrictora quando comparado ao grupo sham. Assim, a diminuição nos níveis de estrogênio liberaria o efeito inibitório do receptor de

estrógeno na transcrição do mRNA da iNOS, resultando no aumento do nível de proteína iNOS. Como a iNOS não requer sinal de cálcio para sua ativação, uma vez expressa, essa enzima é continuamente ativa, levando a geração de elevada concentração de NO (Coleman, 2001). A produção excessiva de NO pela iNOS pode refletir numa elevação nos níveis dos metabólitos de NO, e conseqüentemente, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), essas podem levar a processos inflamatórios e ativação de das proteínas Kinases ativadoras da mitose (MAPK).

Adicionalmente, nas fêmeas ovariectomizadas foi encontrado níveis elevados de citocinas (IL-6 e TNF- α), este dado pode ser relacionado com o esquema proposto pela figura 13, na qual o TNF- α diminui a expressão de eNOS e pode induzir a atividade da NADPH oxidase uma enzima responsável pela produção de ânions superóxidos na vasculatura (Griendling et al, 2000). Assim, na privação de estrogênio onde se encontram níveis aumentados de TNF- α (Kamada et al 2001), alterações na função vascular podem ocorrer.

Entretanto, há estudos que demonstram que a ovariectomia reduz a formação de níveis de NO em aorta de coelhos e artéria mesentérica de ratos (Liu et al., 2001). Assim como o estudo proposto por Zhang & Davigde (1999) onde foi demonstrado que o estrogênio é capaz de produzir uma diminuição na expressão dos receptores adrenérgicos, mais especificamente os receptores α_1 -adrenérgicos e a ovariectomia é capaz de aumentar a expressão desses receptores, colaborando para uma hiperreatividade a NA nas fêmeas ovariectomizadas. Portanto, a relação de ovariectomia com a reatividade vascular apresenta algumas controvérsias e estas podem sofrer a influencia de vários fatores como idade do animal e pela exposição ao longo da vida de ciclos ovarianos e gravidez o que pode gerar impactos na expressão de receptores de estrogênio. (Nawate et al, 2005)

Na curva dose-resposta a Acetilcolina, observou-se uma menor vasodilatação no grupo ovariectomizado quando comparado aos demais grupos, porém após o tratamento com raloxifeno, tamoxifeno e estrogênio essas respostas foram revertidas ao nível dos animais sham. Entretanto, mesmo após o bloqueio dos produtos catalisados pela NOS e ciclooxigenase, utilizando L-NAME e Indometacina

respectivamente, o relaxamento ainda persiste, propõe-se que esteja ocorrendo a liberação de outro fator, o EDHF (Taylor & Weston, 1988), este fator é, particularmente, presente em artérias de resistência e de pequeno calibre (Feletou et al 2006), como o leito vascular mesentérico, como discutimos anteriormente.

Dados da literatura também demonstram a interação do TNF- α e o EDHF, como, por exemplo, os resultados obtidos por Kessler e colaboradores 1999, que relata a interação do TNF- α com o EDHF, onde este último fator encontra-se reduzido em artérias coronárias de porcos, logo um menor relaxamento foi encontrado neste leito.

No esquema proposto na figura 14, a deficiência nos níveis estrogênicos também pode ser considerada um fator de risco, pois pelos estudos citados anteriormente, a fase pós-menopausa leva ao aumento de citocinas, como o TNF- α , e esta potente citocina é capaz de diminuir a expressão de eNOS; diminuir a disponibilidade do EDHF, como demonstramos no nosso estudo, e adicionalmente aumentar a atividade o estado oxidativo das células, por meio de maior atividade da NADPH oxidase (Zhang et al, 2009). Assim, quanto os tratamentos utilizados neste estudo, esses normalizam as concentrações de citocinas, principalmente do TNF- α e também reduzem a expressão da iNOS e possivelmente do estado oxidativo, contribuindo de forma decisiva para a normalização da reatividade vascular. Logo, o tratamento a longo prazo com raloxifeno, tamoxifeno e estrogênio são importantes colaboradores no controle das possíveis alterações vasculares.

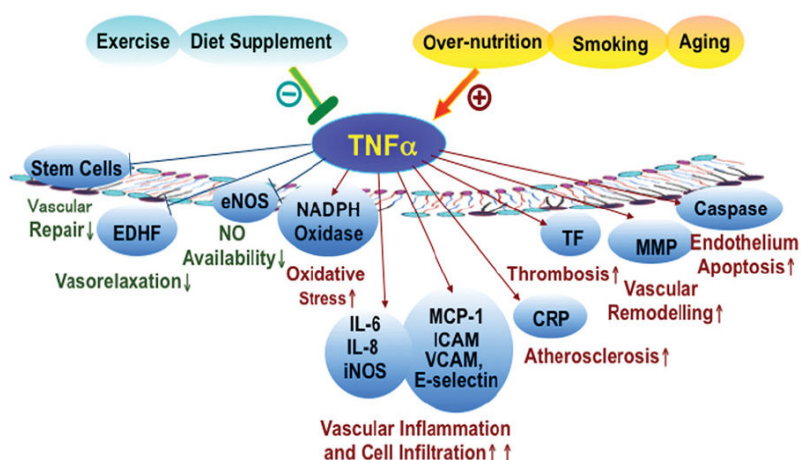


Figura 14: Demonstração de numerosos fatores de risco que podem contribuir para a disfunção endotelial. (Zhang et al, 2009)

Portanto, pode-se concluir que a diminuição dos níveis de estrogênio pode acarretar alterações tanto na concentração de fatores humorais (IL-6 E TNF- α) quanto na reatividade vascular. Isso pode levar ao prejuízo do funcionamento fisiológico, com a perda do equilíbrio entre as reações oxidativas no organismo. Esse desequilíbrio por longos períodos pode provocar elevação da pressão arterial e, possivelmente, desencadear o aparecimento de doenças cardiovasculares. Ainda, com nossos resultados, demonstramos pela primeira vez, no mesmo estudo, que o tratamento com raloxifeno, tamoxifeno e com estrogênio reverteram para níveis normais as concentrações destas citocinas pró-inflamatórias e a reatividade vascular das ratas com deficiência de estrogênio, acrescentando maior entendimento para a ação destes agentes. Entretanto para uso clínico destas drogas em TH se faz necessário mais estudos experimentais e clínicos para avaliar melhor sua ação a longo prazo.

6. REFERÊNCIAS:

Alexander H.S., Raouf A.K (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* 78:539-552

Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST (2005). Chronic tumor necrosis factor- α inhibition enhances NO modulation of vascular in estrogen-deficient rats. *Hypertension* 46:76-81

Barrett-Connor E & Bush TL (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA*, 265: 1861-1867.

Barrett-Connor E (1997). Sex differences in coronary heart disease: why a women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation*; 95: 252-264.

Byyny RL & Speroff L (1996). A clinical guide for the care of older women: primary and preventive care, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins. The rectangularization of life; 1-19.

Christensen KL & Mulvany MJ (1993). Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats. *Journal Vascular Research*, 30; 73-79.

Coleman JW (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1:1397-1406

Dinarello C.A (2007). Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37:S34-45

Dutertre M, Smith CL (2000). Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Action. *Pharmacol Experimental Therapeutics* 295:2

Faletou M, Vanhoutte PM (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H985-H1002

Figtree GA, Webb CM, Collins P. (2000). Tamoxifen acutely relaxes coronary arteries by an endothelium-nitric oxide-and estrogen receptor-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 295:519-523

Gianni W, Ricci A, Gazzaniga P et al (2004). Raloxifene modulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha synthesis in vivo: Result from a pilot clin study *J Clin Endocrinol Metab* 89:6097

Girasole G, Jilka RL, Boswell S, Boder G, Willians DC, Manolagas SC (1992). 17- β estradiol inhibits interleukins production by bone marrow-derived cells and osteoblasts in vitro:a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogen *J Clin Invest* 89:883-891

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). NADP(H) oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501

Hirano T. (1999). Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and growth factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 260(2):303-8

Hozumi Y, Hakamata Y, Nagai H.(2005). Plasma leptin concentration in tamoxifen-treated ovariectomized rats. *Gynecol Obstet Invest.* 2005;59(2):70-4.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Ringgs B, Vittinghoff E (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin replacement study (HERS) Research group. *JAMA*, 280: 605-613.

Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Ohmoto Y, Takeji T, Yasui T, Aono T (2001). Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 184:309-314

Kamari Y, Werman-Venkert R, Shaish A, Werman A, Harari A, Gonen A, Voronov E et al (2006). Differential role and tissue specific of interleukin-1alpha gene expression in atherogenesis and lipid metabolism. *Atherosclerosis* doi10.1016/j.atherosclerosis.2006.11.026

Kesser P, Popp R, Busse R, Schini-Kerth VB (1999). Proinflammatory mediators chronically downregulate the formation of the endothelium-derived hyperpolarizing factor in arteries via a nitric oxide/cyclic GMP-dependent mechanism. *Circulation* 99:1878-1884

Kloosterboer HJ & Ederveen AGH (2003). Pros and cons of existing treatment modalities in osteoporosis: a comparison between tibolone, SERMs and estrogen + progestogen treatments. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83: 157-165.

Koh JM, Khang YH, Jung CH, Bae S, Kim DJ, Chung YE, Kim GS (2005). Higher circulating hsCRP levels are associated with lower bone mineral density in healthy pre- and postmenopausal women: evidence for a link between systemic inflammation and osteoporosis. *Osteoporos Int* 89:735-742.

Leng S, Chaves P, Koenig K, Walston J (2002). Serum interleukin-6 and hemoglobin as physiological correlates in the geriatric syndrome of frailty: a pilot study. *J Am Geriatric Soc* 50:1268-1271

Lerner DJ & Kannel WB (1986). Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *American Heart Journal*, 111: 383-390.

Liu MY, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Sakuma I, Kanno M (2001). Alterations EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric artery of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 132:1035-1046

Lufkin EG, Whitaker MD, Nickelsen T, Argueta R, Caplan RH, Knickerbocker RK (1998). Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial. *J Bone Miner Res* ;13:1747-54.

Mc Gregor DD (1965). The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *Journal of Physiology*, 177: 21-30.

Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes (1999). *J Periodontol.* ;70(7):757-60.

Nash JD, Ozols RF, Smyth JF, Hamilton TC. (1989). Estrogen and anti-estrogen effects on the growth of human epithelial ovarian cancer in vitro. *Obstetric & Gynecology*, 73: 1009-1016.

Nawate S, Fukao M, Sakuma I, Soma T, Nagai K, Takikawa O, Miwa S, Kitabatake A (2005), *British Journal of Pharmacology*. 144: 178-189

Nilsson S, Koehler KF (2005). Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: molecular and cellular pharmacology. *Basis Clin Pharmacol Toxicol* 96:15-25

Opal SM, DePalo VA (2000). Anti-Inflammatory Cytokines. *CHEST*, 117:1162-1172
Osborne CK. (1998) Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 339:1609-1618

Ozaki K, Leonard WJ (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem*, 277(33):29355-8

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000). C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women, *N Engl J Med*. 342(12):836-43

Riccioni G, D'Orazio N, Menna V, Lambo MS, Guagnano MT, Di Ilio C (2003). Role of leptin in anorexia nervosa. *La Clinica Terapeutica*, 154(6): 401-4.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, Lacroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002).

Riskes and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288: 321-333.

Sato M, Rippey MK, Bryant HU (1996). Raloxifene, Tamoxifen, nafoxidine or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J* 10:905-912

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira, K, Fujishima M, Takeshita A (1996). The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 28: 703–711.

Simoncini T, Genazzani AR (2000). Raloxifene acutely stimulates nitric oxide release from human endothelial cells via activation of endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2966-2969

Stampfer MJ & Colditz GA (1991). Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of epidemiologic evidence. *Prev Med*, 20: 47-63.

Stevenson JC (2000). Cardiovascular effects of oestrogen. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 74: 387-393.

Stevenson JC, Crook D, Godsland IF, Collins P & Whitehead MI (1994). Hormone replacement therapy and cardiovascular system nonlipid effects. *Drugs*, 47: 35-41.

Surapisitchat J, Hoefen RJ, Pi Xi, Yoshizumi M, Yan C, Berk BC (2001). Fluid shear stress inhibits THF- α activation of JNK but not ERK $\frac{1}{2}$ or p38 in human umbilical vein endothelial cells: inhibitory crosstalk among MAPK family members. *Proc Natl Acad Sci* 98:6476-6481

Syed V, Ulinski G, Mok SC, Yiu GK, Ho SM (2001). Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Research*, 61: 6768-6776.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder, K, Schofield P, Gusland B, Andrews H, Mayeux R (1996). Effects of estrogen during menopause on risk and age of Alzheimer's disease. *Lancet*, 348: 429-432.

Taniguchi T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268(5208):251-5

Taranta A, Brama M, Teti A, DeLuca V, Scandurra R, Spera G, Agnusdei D, Termine JS, Migliaccio S (2002). The selective estrogen receptor modulator raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from randomized clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3609-3617

Taranta A, Brama M, Teti A, et al.(2002). The selective oestrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. *Bone* 30:368

Tatchum –Talom R, Martel C, Labrie F, Marette A.(2003). Acute vascular effects of the selective estrogen receptor modulator EM-652 (SCH 57068) in the rat mesenteric vascular bed. *Cardiovasc Res* 57: 535-543

Taylor SG & Weston AH (1988). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends in Pharmacological Sciences*, 9: 272–274.

Vanhoutte PM (1996). Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *Journal of Cell Cardiology*, 28:2233-2240

Vila E, Salaices M. (2005). Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(3):H1016-21

Wakatsuki A, Ikenoue N, Shinohara K, Watanabe K, Fukaya T (2003). Effect of lower dosage of oral conjugated equine estrogen on inflammatory markers and endothelial function in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* ; 24;571-576.

Walsh BW, Cox DA, Sashegyi A, Dean RA, Tracy RP, Anderson PW (2001). Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the effects of hormone replacement therapy and raloxifene on CRP in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 88:825-828

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Raunikaar V, Sacks FM (1991). Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of lipoproteins. *The New England Journal of Medicine*, 325: 1196-1204.

Wild RA (1996). Estrogen: effects on the vascular tree. *Obstetrics and Gynecology*, 87: 27-35.

Yoshitake K, Yokota K, Kasugai Y, Kagawa M, Sukamoto T, Nakamura T (1999). Effects of 16 weeks of treatment with tibolone on bone mass and bone mechanical and histomorphometric indices in mature ovariectomized rats with established osteopenia on a calcium-diet. *Bone*, 25: 311-319.

Yu, B.P, Chung H.Y. (2006). The inflammatory process in aging. *Rev Clin Gerontol* 16:179-187

Zhang H, Park Yoonjung, Wu Junxi, Chen Xiu Ping, Lee Sewon, Yang Jiyeon, Dellsperger Kevin C., Zhang C (2009), Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clinical Science*, 116: 219-230

Zhang Y & Davidge ST (1999). Effect of Estrogen Replacement on Vasoconstrictor Responses in Rat Mesenteric Arteries. *Hypertension*, 34;1117-1122